

# VU Research Portal

## Glutathione-S-transferases: tools and targets for characterization of chemically reactive drug metabolites

Boerma, J.S.

2013

### **document version**

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

### **citation for published version (APA)**

Boerma, J. S. (2013). *Glutathione-S-transferases: tools and targets for characterization of chemically reactive drug metabolites*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

### **General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

### **Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

### **E-mail address:**

[vuresearchportal.ub@vu.nl](mailto:vuresearchportal.ub@vu.nl)

## Nederlandse samenvatting

Het ontwikkelen van een nieuw geneesmiddel is een langdurig en kostbaar proces. Een belangrijke reden voor het stoppen van de ontwikkeling van een kandidaat-geneesmiddel is het optreden van Adverse Drug Reactions (ADRs), een verzamelnaam voor verschillende toxische bijwerkingen. Sommige van deze bijwerkingen kunnen in zekere mate voorspeld worden op basis van de structuur van de verbinding, terwijl anderen onvoorspelbaar zijn. Idiosyncratische Adverse Drug Reactions (IADRs) zijn zeer zeldzame en onvoorspelbare toxische reacties die meestal ontdekt worden als een kandidaat-geneesmiddel zich ver in het ontwikkelingsproces bevindt, bijvoorbeeld tijdens klinische studies of als een geneesmiddel al op de markt is toegelaten. Het optreden van ernstige idiosyncratische toxiciteit vormt een gezondheidsrisico voor patiënten en kan leiden tot het van de markt halen van een geneesmiddel. Derhalve heeft de farmaceutische industrie veel interesse in het beter begrijpen van IADRs, zodat voorspellende screens ontwikkeld kunnen worden met betrekking tot deze toxische reacties.

De vorming van reactieve geneesmiddelmetabolieten lijkt een belangrijke rol te spelen in het ontstaan van ADRs en IADRs. Wanneer geneesmiddelen in het lichaam worden opgenomen, ondergaan ze metabolisme (biotransformatie) om hun water oplosbaarheid te verhogen. Dit proces bevordert de uitscheiding van lichaamsvreemde stoffen en wordt voornamelijk uitgevoerd door Cytochroom P450 (CYP) enzymen. Sommige geneesmiddelen worden door CYPs omgezet in reactieve metabolieten, een proces dat aangeduid wordt met de term 'bio-activatie'. De gevormde reactieve metabolieten kunnen gemakkelijk reageren met macromoleculen (bijvoorbeeld eiwitten) in een cel. Om zich tegen dergelijke reactieve metabolieten te beschermen, bevatten cellen glutathion (GSH), een peptide dat reactieve metabolieten kan invangen. De reactie van reactieve metabolieten met GSH (het ontgiften) kan spontaan plaatsvinden, maar wordt ook gekatalyseerd door glutathione-S-transferases (GSTs).

Wanneer reactieve metabolieten van geneesmiddelen niet worden ontgift, kunnen ze irreversibel (covalent) binden aan eiwitten in cellen. De vorming van dergelijke eiwit-adducten kan op tenminste twee manieren leiden tot toxiciteit (ADRs/IADRs). Ten eerste kan irreversibele binding van belangrijke cellulaire eiwitten er toe leiden dat de cel niet meer functioneert en daardoor te gronde gaat. Ten tweede kunnen covalent gebonden eiwitten

(adducten) als lichaamsvreemd worden aangemerkt door het immuunsysteem. De immuunreactie die optreedt kan vervolgens leiden tot orgaan toxiciteit (bijvoorbeeld leverschade).

Vanwege de associatie van reactieve metabolieten met toxiciteit onderzoekt de farmaceutische industrie of metabolieten van kandidaat-geneesmiddelen kunnen binden aan GSH of aan eiwitten. Een hoge mate van covalente binding aan GSH of eiwit kan er toe leiden dat de ontwikkeling van een kandidaat-geneesmiddel afgebroken wordt. Het blijkt echter dat veel veilige geneesmiddelen, die geen ADRs of IADR's veroorzaken, ook covalente binding veroorzaken. Daarom is de selectiviteit van reactieve metabolieten voor bepaalde aminozuren (bouwstenen) in eiwitten waarschijnlijk belangrijker voor het voorspellen van toxiciteit dan de totale covalente binding.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift (GSTs: hulpmiddel en target eiwit voor het karakteriseren van chemisch reactieve metabolieten van geneesmiddelen) is uitgevoerd als onderdeel van Top Instituut Pharma-project D3-201. Belangrijkste doel van dit proefschrift was het ontwikkelen van nieuwe methodes om, gebruikmakend van CYP-afhankelijke bio-activatie van geneesmiddelen, adducten aan individuele eiwitten te kunnen genereren en technieken te ontwikkelen zodat de gevormde geneesmiddel-adducten geanalyseerd kunnen worden. Omdat humane CYPs vaak lage hoeveelheden reactieve metabolieten vormen, hebben we gebruik gemaakt van een bacterieel P450 (CYP102A1M11H) dat zo gemanipuleerd is dat het grote hoeveelheden reactieve metabolieten kan vormen. Als model target eiwit is gekozen voor glutathione-S-transferase P1-1 (GST P1-1). Dit eiwit is gemakkelijk te analyseren en bevat een reactief cysteïne (aminozuur) dat snel reageert met reactieve metabolieten. In aanwezigheid van GSH kunnen GST P1-1 en andere GSTs de binding van reactieve metabolieten aan GSH katalyseren. Een tweede doel van dit proefschrift was daarom het onderzoeken van de rol van GSTs in het ontgiften van reactieve metabolieten van geneesmiddelen.

**Hoofdstuk 1** bevat een inleiding op het proefschrift. Allereerst wordt de rol van reactieve metabolieten bij het ontstaan van ADRs en IADR's bediscussieerd, waarna dieper wordt ingegaan op de vorming van reactieve metabolieten door CYPs (bio-activatie) en de rol die GSTs spelen bij het ontgiften van reactieve metabolieten. Daarnaast wordt een uitgebreid

overzicht gegeven van de benaderingen die in de farmaceutische industrie gebruikt worden om reactieve metabolieten van kandidaat-geneesmiddelen aan te tonen. Omdat veilige geneesmiddelen ook covalente binding veroorzaken en de totale hoeveelheid covalente binding niet voorspellend is voor de toxiciteit, wordt dieper ingegaan op bestaande methoden om covalente binding aan individuele eiwitten te meten. Tenslotte wordt in dit hoofdstuk besproken waarom GST P1-1 een goed model eiwit is om covalente binding te bestuderen en wordt een overzicht gegeven van bestaande literatuur omtrent de covalente binding van dit eiwit.

In **hoofdstuk 2** wordt een methode gepresenteerd waarmee geneesmiddel-adducten aan individuele eiwitten kunnen worden geproduceerd. Het zeer actieve CYP eiwit CYP102A1M11H is gebruikt voor het produceren van reactieve metabolieten, die vervolgens reageren met het model eiwit GST P1-1. CYP102A1M11H kan door middel van affiniteitschromatografie van andere eiwitten worden verwijderd, waardoor adducten aan GST P1-1 gemakkelijker kunnen worden geanalyseerd met een massaspectrometer. Deze methode is met succes toegepast om GST P1-1 adducten van de geneesmiddelen paracetamol, clozapine en troglitazone te genereren. Op basis van de analyse van de verwachte geneesmiddel-adducten aan peptiden (een serie aminozuren) van GST P1-1 konden zogenaamde diagnostische fragmenten worden bepaald, die uniek zijn voor een bepaald peptide van GST P1-1. Onverwachte GST P1-1 adducten van troglitazone werden vervolgens geïdentificeerd door te screenen met behulp van deze diagnostische fragmenten. De in dit hoofdstuk beschreven methode zou gebruikt kunnen worden om de covalente binding van kandidaat-geneesmiddelen aan (model) eiwitten te karakteriseren.

De hierboven beschreven methode om eiwit-adducten te produceren en te identificeren is in **hoofdstuk 3** toegepast op diclofenac, een veelgebruikt geneesmiddel bij de bestrijding van ontstekingen. Diclofenac veroorzaakt zeer ernstige idiosyncratische toxiciteit bij een klein aantal patiënten, die mogelijk het gevolg is van de vorming van reactieve metabolieten. Hoewel is aangetoond dat reactieve metabolieten van diclofenac adducten vormen met eiwitten, is de precieze structuur van de adducten nog niet opgehelderd met massaspectrometrie. Uit ons onderzoek bleek dat bio-activatie van diclofenac door CYP102A1M11H in aanwezigheid van het model eiwit GST P1-1 resulteerde in verschillende diclofenac adducten. De structuur van diclofenac eiwit-adducten verschilde aanzienlijk van eerder

## *Appendices*

waargenomen conjugaten met GSH, een tripeptide dat in de farmaceutische industrie vaak gebruikt wordt als surrogaat voor eiwit. Deze resultaten suggereren dat de covalente binding aan eiwitten niet zomaar voorspeld kan worden op basis van conjugatie van reactieve metabolieten met GSH.

Voor de vorming van eiwit-adducten is in de voorgaande hoofdstukken gebruik gemaakt van het oplosbare bacteriële CYP eiwit CYP102A1M11H, dat door middel van affiniteitschromatografie verwijderd kan worden van het model target eiwit GST P1-1. Bio-activatie van geneesmiddelen kan in deze procedure echter niet worden uitgevoerd met humane CYP eiwitten, omdat CYPs bestaan uit een complex mengsel van membraan-gebonden eiwitten.

Vanwege deze reden is in **hoofdstuk 4** een alternatieve procedure voor het produceren van eiwit-adducten onderzocht. In deze nieuwe procedure vindt de CYP-afhankelijke vorming van reactieve metabolieten plaats in een glazen telpotje waarin ook een dialyse buisje zit met het model target eiwit GST P1-1. De gevormde reactieve metabolieten kunnen vervolgens via een semi-permeabele membraan het model target eiwit bereiken. De bruikbaarheid van deze methode is vervolgens onderzocht voor verschillende geneesmiddelen en er is getest of ook humane P450s gebruikt konden worden voor bio-activatie. Uit dit onderzoek bleek dat de hierboven beschreven methode inderdaad gebruikt kon worden in combinatie met humane CYPs, mits de gevormde reactieve metabolieten een voldoende lange levensduur hadden.

Zoals eerder aangegeven, bevatten cellen het tripeptide GSH om macromoleculen (waaronder eiwitten) te beschermen tegen reactieve metabolieten. Het invangen van reactieve metabolieten door GSH kan spontaan plaatsvinden, maar wordt ook gekatalyseerd door GST P1-1 en door andere GSTs. De aanwezigheid van GSTs in het lichaam is genetisch bepaald, wat betekent dat er verschillen zijn in de hoeveelheden beschermde GST eiwitten bij de bevolking. Er zijn aanwijzingen dat mensen die deficiënt zijn met betrekking tot bepaalde GSTs een hogere kans hebben op idiosyncratische toxiciteit, die mogelijk veroorzaakt wordt door het feit dat ze minder goed beschermd zijn tegen reactieve metabolieten.

In **hoofdstuk 5** is onderzocht of een aantal belangrijke GSTs een rol speelt bij het katalyseren van de GSH conjugatie van reactieve metabolieten van clozapine. Dit geneesmiddel, dat gebruikt wordt bij de behandeling van schizofrenie, veroorzaakt bij sommige patiënten

agranulocytose en leverschade. Een reactief metaboliet, het clozapine nitrenium ion, is mogelijk de oorzaak van deze toxiciteit. In ons onderzoek werd aangetoond dat GSTs een belangrijke rol speelden in de GSH conjugatie (het ontgiften) van het nitrenium ion van clozapine. Het bleek dat GSTs niet alleen een effect hadden op de hoeveelheid GSH conjugatie, maar ook op de regioselectiviteit van de GSH conjugatie. Vervolgonderzoek is nodig om te achterhalen of mensen met een genetisch bepaalde deficiëntie met betrekking tot deze GSTs ook gevoeliger zijn voor de toxische bijwerkingen van clozapine.

Tijdens ons onderzoek naar de eiwit-adducten van diclofenac (zie **hoofdstuk 2**) werd ook een reactief metaboliet ontdekt dat niet spontaan reageert met GSH, maar alleen conjugeert met GSH onder invloed van GSTs. De precieze structuur van de reactieve metaboliet en de CYP eiwitten die verantwoordelijk zijn voor deze bio-activatie route waren nog niet opgehelderd. In **hoofdstuk 6** is daarom onderzocht welk mechanisme ten grondslag ligt aan de vorming van dit GST-afhankelijke GSH conjugaat van diclofenac. Alle geteste CYP eiwitten bleken het GST-afhankelijke GSH conjugaat van diclofenac te kunnen produceren, in tegenstelling tot de overige GSH conjugaten die slechts door enkele CYPs werden gevormd. Uit vervolgonderzoek werd duidelijk dat diclofenac waarschijnlijk een door heem-eiwitten gekatalyseerde één elektron oxidatie ondergaat, waardoor een reactief stikstof radicaal cation ontstaat dat onder invloed van GSTs reageert met GSH. Toekomstig onderzoek moet aantonen of dit GST-afhankelijke GSH conjugaat van diclofenac, en daarmee de reactieve metaboliet, ook in patiënten gevonden wordt.

Concluderend: in dit proefschrift worden verschillende methoden beschreven waarmee reactieve metabolieten van geneesmiddelen kunnen worden bestudeerd. Zo kunnen het bacteriële CYP eiwit CYP102A1M11H en humane CYPs gebruikt worden om adducten van reactieve metabolieten aan individuele eiwitten te genereren. Deze methodieken kunnen toegepast worden om de covalente binding van kandidaat-geneesmiddelen aan geselecteerde (model) eiwitten te karakteriseren. Daarnaast blijkt uit dit proefschrift dat GSTs een belangrijke rol spelen in het katalyseren van de GSH conjugatie van reactieve metabolieten en dat sommige reactieve metabolieten alleen ingevangen worden met GSH onder invloed van GSTs. Patiënten die genetisch deficiënt zijn met betrekking tot bepaalde beschermende GSTs zouden daarom gevoeliger kunnen zijn voor idiosyncratische toxiciteit die het gevolg is van covalente eiwit binding door reactieve metabolieten.